

Certificate of Mailing

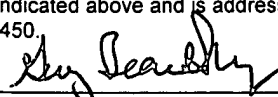
Date of Deposit: November 19, 2003

Label Number: EL993752177US

I hereby certify under 37 C.F.R. § 1.10 that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as "Express Mail Post Office to Addressee" with sufficient postage on the date indicated above and is addressed to Mail Stop Patent Application, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Guy E. Beardsley

Printed name of person mailing correspondence



Signature of person mailing correspondence

APPLICATION
FOR
UNITED STATES LETTERS PATENT

APPLICANT : Ortrud K.Steinlein and Joe Dramiga

TITLE : KNOCK-IN-MOUSE

Knock-in-Mouse

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Tiere, insbesondere eine Knock-in-Maus sowie einen Targetingvektor, der zur Generierung eines solchen Tieres wie einer Knock-in-Maus vorgesehen ist. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Stammzellen, vorzugsweise murine embryonale Stammzellen, die diesen Targetingvektor enthalten sowie ein Screeningverfahren zur Identifizierung von Verbindungen zur Behandlung des humanen Epilepsiesyndroms, insbesondere der familiären nächtlichen Frontallappenepilepsie (ADNFLE).

10 Nach aktuellen Schätzungen leiden etwa 0,4 bis 1 % der Bevölkerung an Epilepsie, die damit die zweithäufigste neurologische Erkrankung ist. Obwohl die verfügbaren Antiepileptika als wirksam gelten, ist bei 15 bis 20 % der Patienten keine ausreichende Anfallskontrolle möglich; damit ist ein nicht unerhebliches Risiko verbunden, bleibende Hirnschäden zu erleiden. Etwa jeder zehnte schwere Status Epilepticus, d.h. schwere Anfälle in schneller
15 Abfolge, führt heute noch zum Tod. 40 % der Erkrankungen gehören zu den idiopathischen Epilepsien (IE), also Epilepsien, für die sich bisher keine spezifischen Ursachen haben finden lassen und die mit einer Prävalenz von 0.6 % zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen gehören (Sander, 1996). Konkordanzraten von 80 % bei eineiigen Zwillingen und 20 % bei zweieiigen Zwillingen belegen eine vorwiegend genetische Ätiologie. Das Erkrankungsrisiko
20 von 5-10 % bei Angehörigen ersten Grades und die intrafamiliäre Variabilität der IE des Kindes- und Jugendalters weisen auf eine Beteiligung mehrerer genetischer Faktoren hin.

Für die idiopathische, erst kürzlich beschriebene, autosomal dominant vererbte nächtliche Frontallappenepilepsie (ADNFLE) (Scheffer et al., 1994, 1995) sind aus dem Non-REM-
25 Schlaf heraus auftretende Cluster motorischer Anfälle charakteristisch, die erstmals zumeist im ersten oder zweiten lebensjahrzehnt auftreten. Die betroffenen Patienten wachen kurz nach dem Einschlafen oder in den frühen Morgenstunden mit einer unspezifischen Aurasymptomatik auf, der rasch motorische Anfälle mit tonischen oder hyperkinetischen Bewegungsabläufen folgen. Der Anfallsbeginn wird durch Keuch- oder Grunzlaute oder
30 kurze Vokalisationen markiert. Das Bewusstsein bleibt bei den Anfällen zumeist erhalten, weshalb diese nicht selten als Parasomnien, Alpträume oder hysterische Anfälle fehlgedeutet werden (Scheffer et al. 1994). Die ADNFLE zeigt 70%-ige Penetranz und eine beträchtliche intrafamiliäre Variation des Schweregrades (Scheffer et al. 1997). Die Mehrheit der betroffenen Patienten zeigt einen normalen Intellekt, einen normalen EEG-Befund und keine

- neurologischen Abnormalitäten (Niedermeyer 1997, Niedemeyer 1997b, Scheffer et al., 1995). In einigen Familien zeigen sich allerdings auch gehäuft psychomotorische Entwicklungsretardierungen oder psychiatrische Erkrankungen. Es gibt keine Hinweise für pathologische Veränderungen bestimmter Hirnstrukturen. Die Lokalisation der epileptogenen Zone mittels Oberflächen-EEGs ist nicht möglich (Haymann et al., 1997). Das Mann/Frau-Verhältnis der ADNFLE ist 7:3 (Provini et al., 1999). Die ADNFLE persistiert während des gesamten Erwachsenenlebens, ist aber in der Regel mit Carbamazepin gut behandelbar (Gambardella et al., 2000, Provini et al., 1999, Scheffer et al., 1995). Es gibt jedoch auch Fälle von ADNFLE, die antiepileptikaresistent sind (Scheffer et al., 1997).
- 1995 konnte bei einer australischen Familie die genetische Kopplung der ADNFLE mit dem Chromosomenlokus 20q13.2-13.3 (Phillips et al. 1995) gezeigt werden. Die molekulargenetische Stammbaumanalyse dieser ADNFLE-Familie führte zur Aufdeckung einer Missense-Mutation im Gen für die $\alpha 4$ -Untereinheit des neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptors (Steinlein et al. 1995). Bei dieser Missense-Mutation wurde ein Cytosin im Nukleotid 743 durch ein Thymin ausgetauscht, was dazu führte, dass ein Serin durch ein Phenylalanin in der zweiten Transmembrandomäne (TM2) der $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR ausgetauscht wurde (\rightarrow Mutation S248F). Erstmals konnte hier der für eine idiopathische Epilepsie verantwortliche Gendefekt identifiziert werden. Zusätzlich fand die Arbeitsgruppe von Steinlein eine norwegische Familie mit ADNFLE (Typ 1) bei der durch die Insertion von 3 Nukleotiden in das Nukleotid 776 ein zusätzliches Leucin hinter das Leucin 259, am c-terminalen Ende der TM2 der $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR, eingeführt wurde (\rightarrow L259-260ins mutation; Steinlein et al., 1997).
- In Japan fand man eine weitere ADNFLE Familie (Typ 1) bei der durch eine Missense-Mutation im Nukleotid 755 ein Cytosin durch ein Thymin ausgetauscht wurde, was dazu führte, dass in der TM2 der $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR das Serin252 durch Leucin ausgetauscht wurde (\rightarrow Mutation S252L; Hirose et al., 1999). Zwei andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass bei einer anderen Form der ADNFLE (Typ 3), zwei verschiedene, die gleiche Aminosäure betreffende Missense-Mutationen im Gen für die $\beta 2$ -Untereinheit des nAChR verantwortlich sind (\rightarrow Mutation V287L; de Fusco et al., 2000) und (\rightarrow Mutation V287M; Phillips et al., 2001).

Nur wenige idiopathische Epilepsien, wie die ADNFLE, folgen einem einfachen Erbgang. Für die Erforschung der Ursachen epileptischer Anfälle sind diese monogen bedingten Epilepsieformen aufgrund des direkten Zusammenhangs von Genwirkung und Phänotyp sehr nützlich.

5

Bisher existiert kein einziges Tier- respektive Mausmodell für ein menschliches Epilepsiesyndrom, sondern lediglich Mausmutanten die epileptische Anfälle in Kombination mit einer Ataxie zeigen (Noebels, 1999, Burgess & Noebels, 1999). Diese Mutationen befinden sich in Genen für Untereinheiten von verschiedenen spannungsgesteuerten Calcium-

10

Kanälen (Noebels, 1999, Burgess & Noebels, 1999). Die Trennung von epileptischen Anfällen und epileptischen Syndromen ist jedoch entscheidend für die Behandlung und Prognose. Die Prognose wird davon abhängen, an welchem Epilepsiesyndrom der betreffende Patient leidet und welche Ätiologie zugrunde liegt. Therapieempfehlungen beziehen sich entsprechend nicht auf einzelne Anfallsformen,

15

sondern auf das Epilepsiesyndrom. Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein System zur Untersuchung des humanen Epilepsiesyndroms bereitzustellen. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Screeningverfahren nach neuen Arzneistoffen zur Behandlung der Epilepsie

20

bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch den in den unabhängigen Ansprüchen und in der Beschreibung gekennzeichneten Gegenstand gelöst. Weitere und bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Unteransprüchen und in der Beschreibung.

25

Die erfindungsgemäße Lösung des oben genannten Problems erfolgt durch Generierung eines Tieres, vorzugsweise einer Knock-in-Maus, die eine Missense-Mutation in der β_2 -Untereinheit des neuronalen nAChR aufweist.

30

Neuronale nAChR sind aus α - und β - Untereinheiten in einer zwei zu drei Stöchiometrie aufgebaut. Es gibt neun verschiedene neuronale α - Untereinheiten ($\alpha_2 - \alpha_{10}$) und drei neuronale β -Untereinheiten ($\beta_2 - \beta_4$). Die aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzten Ionenkanäle unterscheiden sich in ihren elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften. In allen Untereinheiten liegen vier Transmembranhelices

(TM1 bis TM4) vor, die Innenwand der Pore wird wahrscheinlich von der TM2-Helix gebildet. Nähere Informationen über den neuronalen nAChR sind in: Changeux & Edelstein, Current Opinion in Neurobiology, 2001, 11, 369-377 zu finden.

- 5 Der Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zu Grunde, dass trotz der genetischen Heterogenität sich alle bisher entdeckten Mutationen die mit ADNFLE gekoppelt sind, in den Genen für die Untereinheiten des nAChR befinden. Bedeutende Veränderungen betreffen insbesondere die TM2 der $\alpha 4$ - und der $\beta 2$ -Untereinheit, die Teil der kanalbildenden Pore und für die Ionenselektivität verantwortlich ist. Die funktionelle Wichtigkeit dieser Domäne zeigt
 10 sich u. a. darin, dass ihre Aminosäurezusammensetzung beim Vergleich sehr unterschiedlicher Arten, z.B. Maus, Mensch, Ratte streng konserviert ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich hierbei um die Missense-Mutationen V287L oder V287M im Gen für die $\beta 2$ -Untereinheit. Die spezifische, in einer
 15 ADNFLE-Familie gefundenen Missense Mutation V287L und V287M sind –wie eingangs erwähnt- bereits bekannt (de Fusco et al., 2000 bzw. Phillips et al., 2001, s.o.).

Eine murine $\beta 2$ -Untereinheit, d.h. das *Mus musculus* neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta 2 (*acrb2*) Gen, ist seit 1999 bei Gene-Bank unter der Nummer AF077187 abgelegt und
 20 öffentlich zugänglich.

Darüberhinaus umfasst die vorliegende Erfindung auch weitere Knock-in-Mäuse mit Missense-Mutationen in der TM2 und auch der TM3 anderer Untereinheiten, z.B. der übrigen β und auch der verschiedenen α -Untereinheiten, wie insbesondere die eingangs erwähnten
 25 Mutationen S248F, 259-260ins mutation, S252L wie auch 766ins3 in der $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR-Rezeptors.

Darüberhinaus betrifft die Erfindung insbesondere eine bisher unbekannte Mutation in der $\alpha 4$ -Untereinheit, nämlich T265I. D.h., in der $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR-Rezeptors ist in Position
 30 265 Theronin durch Isoleucin ersetzt. Die Mutation tritt am extrazellulären Ende der zweiten Transmembrandomäne auf. Funktionelle Studien von $\alpha 4$ -T265I zeigten eine erhöhte ACh-Empfindlichkeit der mutierten Rezeptoren. $\alpha 4$ -T265I ist mit einer ungewöhnlich niedrigen Penetranz für Epilepsie und keiner erhöhten Carbamazepin-Empfindlichkeit verbunden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Knock-in-Maus die oben genannten Missense-Mutationen homozygot oder heterozygot.

Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin einen Targetingvektor, der die folgenden
5 Komponenten in funktioneller Verbindung enthält:

- die genomische und/oder cDNA-Sequenz, die für eine Untereinheit, des vorzugsweise menschlichen oder murinen, nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR), die eine Missense-Mutation in der $\alpha 4$ oder $\beta 2$ -Untereinheit aufweist, oder einen Teil hiervon kodiert, wobei der Teil zumindest die Missense-Mutation in der $\alpha 4$ oder $\beta 2$ -Untereinheit
10 aufweist,
- ein selektierbares Markergen, und
- wahlweise zwei Erkennungssequenzen für eine Rekombinase, die das Markergen flankieren.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem selektierbaren Marker um ein Antibiotikaresistenzgen.

15 In der vorliegenden Erfindung können jedoch auch weitere Selektionsmarker verwendet werden, d.h. Gene, die unter bestimmten selektiven Bedingungen nur dem Träger dieser Gruppe ein Überleben erlauben.

20 Die beiden Erkennungssequenzen für eine Rekombinase, die das Markergen flankieren sind vorzugsweise loxP.

Die Cre-Rekombinase stammt aus dem E. coli Bakteriophagen P1 und vermittelt die ortsspezifische Rekombination zwischen zwei identischen loxP-Motiven in einer intramolekularen oder intermolekularen Weise. Die Rekombinase Cre des E. coli Bakteriophagen
25 P1 ist eine ortsspezifische Rekombinase, die eine DNA-Neuordnung über seine DNA-Zielsequenz, nämlich loxP, vermittelt. Die loxP-Sequenzen bestehen aus einer 8 bp Spacer Region, die von zwei 13 bp invertierten Wiederholungen (inverted repeats) flankiert wird, die als Erkennungssequenzen für die DNA-Bindung von Cre dienen. Das Rekombinationsereignis ist lediglich von diesen beiden Bestandteilen abhängig und wird mit absoluter Zuverlässigkeit
30 durchgeführt. Es wurde erkannt, dass das Cre-loxP-System, genauso wie das Flp-FRT System von *S. cerevisiae* Rekombinationsereignisse in prokaryontischen ebenso wie in eukaryontischen Zellen wirkungsvoll katalysiert, einschließlich derjenigen aus Hefe, Pflanzen, Insekten und Säugetieren. Ortsspezifische Rekombinationssysteme werden in großem Umfang als Werkzeuge für konditionelle genetische Veränderungen in einzelnen

Zellen und Tieren verwendet. Bei einer Exzision wird der Bereich einer DNA-Sequenz zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen herausgeschnitten.

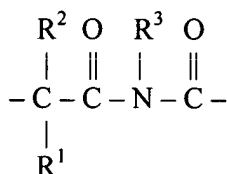
Es existiert eine Vielzahl von weiteren ortsspezifischen Rekombinationssystemen, die auf einem Zweikomponenten-System basieren und im vorliegenden Fall verwendet werden können. Allen derartigen Systemen ist gemein, dass sie spezifische, sich wiederholende DNA Sequenzen aufweisen. Diese Sequenzen bestehen jeweils aus zwei Erkennungssequenzen, die durch einen Spacer voneinander getrennt sind und zueinander invers repetitiv sind. Die beiden Komponenten sind hierbei identisch. Neben den bereits oben genannten Beispielen sind noch das *Zygosaccharomyces rouxii* pSR1-, das Resolvase-rfsF- und das Phagen Mu Gin Rekombinase-System zu nennen.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Stammzellen, vorzugsweise murine embryonale Stammzellen, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert worden sind.

Die in der vorliegenden Erfindung bereit gestellten Tiere, insbesondere Knock-in-Mäuse sind vorzugsweise in Screeningverfahren zur Identifizierung von Verbindungen zur Behandlung des humanen Epilepsiesyndroms, insbesondere der familiären, nächtlichen Frontallappenepilepsie (ADNFLE) einsetzbar, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen eines erfindungsgemäßen Tieres, insbesondere Knock-in-Maus und von Testverbindungen;
- b) Verabreichen der Testverbindungen an das Tier z. B. die Maus,
- c) Auswählen einer Testverbindung, die eine Linderung oder Beseitigung der Symptome des Epilepsiesyndroms bei der Maus ergeben, und
- d) wahlweise Wiederholen der Schritte a)-c) mit einer in geeigneter Weise modifizierten Form der in c) ausgewählten Testverbindung.

Als Testverbindungen zum Einsatz in Schritt a) kommen vorzugsweise Mitglieder der folgenden Stoffgruppen zum Einsatz: Barbiturate, Hydantoine, Oxazolidindione und Succinimide. Im Allgemeinen sind alle Verbindungen als mögliche Testverbindungen anzusehen, die als gemeinsames Strukturelement die Gruppierung:



aufweisen. Auch hiervon abweichende Verbindungen können als Testverbindungen eingesetzt werden, insbesondere die Derivate von Benzodiazepinen, Sultiam, Carbamazepin und der Valproinsäure.

5

Gemäß einem Grundgedanken betrifft die vorliegende Erfindung Verbindungen zur Behandlung des humanen Epilepsiesyndroms, insbesondere von ADNFLE, die durch das vorgenannte Screeningverfahren identifiziert worden sind.

- 10 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ganz allgemein Nukleinsäuremoleküle von mindestens 15 Nukleontiden Länge die von den oben beschriebenen Allelen der $\alpha 4$ - bzw. der $\beta 2$ -Untereinheiten des nACh-Rezeptors abgeleitet sind und die eine Mutation an eine der vorstehend beschriebenen Position aufweisen, vorzugsweise eine Missense-Mutation oder äquivalente Mutationen, die zum gleichen Ergebnis führen. Die erfindungsgemäßen
- 15 Nukleinsäuremoleküle bestehen vorzugsweise aus 15 bis 100 Nukleotiden, besonders bevorzugt aus 15 bis 50 Nukleotide, insbesondere bevorzugt 15 bis 25 Nukleotide. Natürlich können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auch weitere Nukleinsäuresequenzen enthalten, beispielsweise in Form von Fusionspolynukleotiden, die wiederum in bestimmten Ausführungsformen Fusionsproteine kodieren können. Natürlich betrifft die vorliegende
- 20 Erfindung auch partielle und vollständige cDNA-Moleküle, die die vorstehenden und in den Beispielen beschriebenen Varianten der $\alpha 4$ - und der $\beta 2$ - unter Einheit des nACh-Rezeptors kodieren.

- Ferner betrifft die Erfindung Bindungsmoleküle, insbesondere Antikörper und davon abgeleitete Fragmente und Derivate, die an die $\alpha 4$ - bzw. der $\beta 2$ - Untereinheit des nACh-Rezeptors bindend und spezifisch für die vorstehend beschriebenen Missense-Mutationen sind, so dass die erfindungsgemäßen Bindungsmoleküle als gezielte Diagnostika und ggf. Therapeutika eingesetzt werden können.
- 25

- 30 Ferner betrifft die Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die solche Bindungsmoleküle insbesondere Antikörpersequenzen kodieren, sowie Vektoren die eine der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuremoleküle und Sequenzen kodieren und Wirtszellen die solche Nukleinsäuremoleküle bzw. Vektoren enthalten. Besonders bevorzugt sind dabei tierische Wirtszellen, in denen ein oder beide der erfindungsgemäßen Untereinheiten des nACh-

Rezeptors exprimiert werden und ein mehr oder weniger funktionellen Rezeptor rekonstituieren, siehe auch die Beispiele dazu.

5 Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung auch ganz allgemein Screening-Verfahren, in denen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, davon kodierte Proteine sowie die beschriebenen Wirtszellen zum Auffinden von spezifischen Wirkstoffen verwendet werden. Allgemeine Screening-Verfahren, die dementsprechend erfindungsgemäß eingesetzt werden, sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt. Beispielsweise kann auch das Expressionssystem wie in den Beispielen beschrieben für ein Screening-Verfahren
10 erfindungsgemäß verwendet werden.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die eine der vorstehend beschriebenen Komponenten wie Nukleinsäuremoleküle, Peptide, die von der $\alpha 4$ - oder der $\beta 2$ - unter Einheit des nACh-Rezeptors abgeleitet sind und die jeweilige Missense-
15 Mutation tragen, dafür spezifische Antikörper, Vektoren, und/oder Wirtszellen enthalten, und die vorzugsweise für diagnostische und Screening-Verfahren verwendbar sind. Beispiele hier sind pharmakogenomische und forensische Anwendungen, SNP-Analyse, Drug-tailoring, und andere.

20 Gleichfalls betrifft die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, vorzugsweise pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine der vorstehend beschriebenen Komponenten enthalten, insbesondere spezifische Antikörper und/oder durch das erfindungsgemäße Screening-Verfahren aufgefundene Wirkstoffe, wie Idealerweise in der Lage sind entweder die beschriebene Mutation zu kompensieren und/oder den nACh-Rezeptor in soweit zu
25 beeinflussen, dass er trotz der entsprechenden Mutation im Wesentlichen wieder normal funktioniert.

Aus der vorliegenden Erfindungsbeschreibung wird dem Fachmann auch klar sein, dass die Erfindung in keiner Weise auf beispielsweise Maus beschränkt ist sondern ganz allgemein
30 anwendbar ist, was auch für die ansonsten beschriebenen Ausführungsformen wie die Knock-In-Maus zutrifft. Andere Tiere die erfindungsgemäß hergestellt werden können sind bspw. Hamster, Kaninchen, Ratten, etc. Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung ganz allgemein transgene Tiere, die eine Missense-Mutation in der $\alpha 4$ - oder $\beta 2$ -Untereinheit des neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) aufweisen, sowie ganz allgemein

Stammzellen von Säugetieren, die entsprechend der vorstehend beschriebenen Ausführungsform genetisch verändert worden sind.

5 Bezüglich Diagnose und Screening-Verfahren, betrifft die vorliegende Erfindung auch Anwendungen, in denen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, Proteine bzw. Peptide, Antikörper oder auch Wirtszellen verwendet werden. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung in dieser Hinsicht Chips und Arrays, insbesondere MicroArrays, die mit einem der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Komponenten beladen sind, und ggf. noch weitere Komponenten enthalten wie Nukleinsäuren von anderen Allelen der
10 Untereinheiten des nACh-Rezeptors.

Gemäß einem weiteren Grundgedanken betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine oder mehrere der wie vorher erwähnt identifizierten Verbindungen und einen pharmazeutisch verträglichen Träger aufweist.
15

Die Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise zusammen mit geeigneten Trägern oder Trägerstoffen in Dosen so vermischt, daß die Erkrankung behandelt oder zumindest gelindert wird. Eine derartige Zusammensetzung kann (zusätzlich zu den Wirkstoffen und dem Träger) Verdünnungsmittel, Füllmaterialien, Salze, Puffer,
20 Stabilisatoren, Lösungsvermittler und andere Materialien enthalten, die an sich bereits bekannt sind. Der Begriff "pharmazeutisch verträglich" soll ein nichttoxisches Material definieren, das die Wirksamkeit der biologischen Aktivität des aktiven Inhaltsstoffes bzw. Wirkstoffes nicht stört. Die Auswahl des Trägers hängt vom Verabreichungsweg ab.

25 Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zusätzlich weitere Mittel enthalten, die die Aktivität des Wirkstoffes steigern oder dessen Aktivität oder Verwendung bei der Behandlung ergänzen. Derartige zusätzliche Faktoren und/oder Mittel können in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten sein, um eine synergistische Wirkung zu erzielen oder um Nebenwirkungen bzw. unerwünschte Wirkungen zu minimieren. Techniken
30 zur Formulierung bzw. Zubereitung und Verabreichung der Verbindungen der vorliegenden Anmeldung sind in "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, letzte Ausgabe, zu finden.

Der Begriff „therapeutisch wirksame Dosis“ bezieht sich auf eine Menge der Verbindung, die ausreicht, um eine Verbesserung der Symptome zu erreichen, beispielsweise eine Behandlung, Heilung, Prävention oder Verbesserung derartiger Zustände. Geeignete Verabreichungswege können beispielsweise orale, rektale, transmukosale oder intestinale Verabreichung und parenterale Verabreichung einschließen, einschließlich intramuskulärer, subkutaner, intramedullärer Injektionen ebenso wie intrathekalen, direkt intraventrikulärer, intravenöser, intraperitonealer oder intranasaler Injektionen.

Die pharmazeutischen Zubereitungen, die oral verwendet werden, schließen Hartgelatinekapseln, ebenso wie Weichgelatinekapseln ein, die aus Gelatine und einem Weichmacher, wie beispielsweise Glycerol oder Sorbitol, hergestellt sind. Die Hartgelatinekapseln können die wirksamen Verbindungen mit Füllstoffen, wie beispielsweise Lactose, Bindemitteln wie beispielsweise Stärken und/oder Gleitmitteln, wie beispielsweise Talkum oder Magnesiumstearat und wahlweise Stabilisatoren vermischt enthalten. Bei Weichgelatinekapseln werden die wirksamen Verbindungen vorzugsweise in geeigneten Flüssigkeiten gelöst oder suspendiert, wie beispielsweise in gepufferter Salzlösung. Zusätzlich können Stabilisatoren zugesetzt werden.

Zusätzlich zur Verabreichung in flüssiger Form, beispielsweise in einer Gelatinekapsel oder einem anderen geeigneten Träger, können die pharmazeutischen Zubereitungen geeignete Trägerstoffe zur Erleichterung der Verarbeitbarkeit der wirksamen Verbindungen in Zubereitungen enthalten, die pharmazeutisch verwendet werden. Somit können pharmazeutische Zubereitungen zur oralen Anwendung durch Binden der Lösung der wirksamen Verbindungen an einen festen Träger, wahlweise Vermahlen des sich ergebenden Gemisches und Verarbeiten des Gemisches zu Granulaten nach Zusatz von geeigneten Hilfsmitteln, falls erwünscht oder notwendig, gewonnen werden, um Tabletten oder Drageekerne herzustellen.

Geeignete Trägerstoffe sind insbesondere Füllmittel, wie beispielsweise Zucker, beispielsweise Lactose oder Saccharose, Mannitol oder Sorbitol, Cellulosezubereitungen und/oder Calciumphosphate, beispielsweise Tricalciumphosphat oder Calciumhydrogenphosphat, ebenso wie Bindemittel, wie beispielsweise Stärke, beispielsweise Maisstärke, Weizenstärke, Reisstärke, Kartoffelstärke, Gelatine, Tragant, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose und/oder

Polyvinylpyrrolidon. Falls dies erwünscht ist, können Sprengmittel bzw. Desintegrationsmittel zugesetzt werden, wie beispielsweise die oben erwähnten Stärken und ebenfalls Carboxymethyl-Stärke, vernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar oder Alginsäure oder Salze hiervon, wie beispielsweise Natriumalginat. Hilfsstoffe sind vor allem

5 Fließregulierungsmittel und Gleitmittel, beispielsweise Siliciumdioxid, Talkum, Stearinsäure und Salze hiervon, wie beispielsweise Magnesiumstearat oder Calciumstearat und/oder Polyethylenglycol. Drageekerne werden mit geeigneten Beschichtungen versehen, falls dies erforderlich ist, sind sie gegen Magensäfte beständig. Zu diesem Zweck können konzentrierte Zuckerlösungen verwendet werden, die wahlweise Gummi arabicum, Talkum,

10 Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglycol und/oder Titandioxid, Lacklösungen und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische enthalten. Um Beschichtungen bzw. Deckschichten zu erzeugen, die gegenüber Magensäure resistent sind, werden Lösungen geeigneter Cellulosezubereitungen, wie beispielsweise Acetylcellulosephthalat oder Hydroxypropylmethyl-Cellulosephthalat verwendet.

15 Geeignete Zubereitungen zur intravenösen oder parenteralen Verabreichung schließen wässrige Lösungen der wirksamen Verbindungen ein. Eine typische Zusammensetzung für eine intravenöse Infusion kann z.B. so hergestellt werden, daß sie 250 ml sterile Ringer'sche Lösung und z.B. 10 mg Arzneistoff enthält. Siehe Remington's Pharmaceutical Science (15.

20 Ausgabe, Mack Publishing Company, Easton, Ps., 1980). Zusätzlich können Suspensionen der aktiven Verbindungen wie ölige Injektionssuspensionen verabreicht werden. Wässrige Injektionssuspensionen können Substanzen enthalten, die die Viskosität der Suspension erhöhen und beispielsweise Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbitol und/oder Dextran einschließen. Wahlweise kann die Suspension weiterhin Stabilisatoren enthalten.

25 Die vorgenannten Verbindungen bzw. die pharmazeutische Zusammensetzung finden vorzugsweise Verwendung zur Behandlung des humanen Epilepsiesyndroms, insbesondere der ADNFLE.

30 Der Offenbarungsgehalt der vor- und nachstehend zitierten Dokumente aus dem Stand der Technik ist hiermit durch Bezugnahme in dieser Anmeldung enthalten, insbesondere betreffend die Herstellung von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, damit beladene Chips und Arrays, Vektoren, Wirtszellen, Antikörper, transgene Tiere, etc. Diese und andere Ausführungsformen sind dem Fachmann offenbart und offensichtlich und umfasst durch die

Beschreibung und die Beispiele der vorliegenden Erfindung. Weiterführende Literatur zu einer der oben angeführten Werkstoffen und elektronischen Hilfsmitteln, die im Sinne der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, können dem Stand der Technik entnommen werden, z.B. aus öffentlichen Bibliotheken unter z.B. der Benutzung
 5 elektronischer Hilfsmittel. Zudem bieten sich andere öffentliche Datenbanken an wie die „Medline“, die über das Internet zur Verfügung stehen.

Techniken zur Ausführung der Erfindung sind dem Fachmann bekannt und können der einschlägigen Literatur entnommen werden, siehe beispielsweise Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory
 10 Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987);
 15 Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press,
 20 London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Extracting information from cDNA arrays, Herzel et al., CHAOS 11, (2001), 98-107.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Zeichnungen sowie der Beispiele
 25 veranschaulicht. In den Zeichnungen zeigt:

Fig. 1: Zeigt den Stammbaum einer deutschen Familie mit ADNFLE (siehe Bsp. 2); Ausgefüllte Symbole zeigen Familienmitglieder mit ADNFLE-Diagnose an. +, Individuen, die bez. der $\alpha 4$ -T265I-Mutation heterozygot waren; -, Familienmitglieder
 30 ohne $\alpha 4$ -T265I-Mutation; *, keine Molekularanalyse verfügbar;

Fig. 2: A, ACh-Dosis-Wirkungskurve der Kontrolle (nicht ausgefüllte Dreiecke) und von $\alpha 4$ -T265I enthaltenden Rezeptoren (ausgefüllte Dreiecke). Die Kurven durch die Dreiecke sind die besten Anpassungen, die mit Gleichung 1 erzielt wurden.

B, durch ACh hervorgerufene Ströme bei unterschiedlichen Agonistenkonzentrationen sind für die Kontrolle überlagert (obere Spuren) und für den Mutanten, der einen Rezeptor enthält (untere Spuren). Die Balken zeigen den Zeitverlauf der ACh-Anwendung an.

5 C, CBZ-Dosis Wirkungshemmkurven für die Kontrolle (nicht ausgefüllte Dreiecke) und für $\alpha 4$ -T265I enthaltende Rezeptoren (ausgefüllte Quadrate). Die Datenpunkte wurden am Ende der ACh- und CBZ-Co-Verabreichung gemessen. Die Kurven durch die Datenpunkte sind die besten Anpassungen, die mit Gleichung 2 erzielt wurden.

10 D, durch ACh hervorgerufene Ströme, die zuerst in der Kontrolle (dünne Linie) und dann in Gegenwart von CBZ (dicke Linie) aufgezeichnet wurden, sind überlagert. Die oberen Spuren wurden in einer Oozyte aufgezeichnet, die den $\alpha 4$ -T265I Mutanten exprimiert.

Beispiele

15

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand eines Beispiels veranschaulicht. Die Erfindung ist jedoch nicht auf dieses konkrete Beispiel beschränkt.

Beispiel 1:

20 Zunächst wurde das Gen für die $\beta 2$ -Untereinheit des nAChR aus einer genomischen Bank als auch die entsprechende cDNA des Mausstammes C57/BL6 isoliert, subkloniert und von beiden Seiten sequenziert. Die Punktmutation (ADNFLE missense-Mutation V287L) wurde mittels PCR sowohl in die genomische DNA als auch in die cDNA des Gens für die $\beta 2$ -Untereinheit der Maus eingeführt.

25

Die genomische DNA wurde in einen Flox-and Replace-Vektor zur Transfektion von ES-Zellen kloniert. Isogene embryonale ES-Zellen des Mausstammes C57/BL6 und Feeder-Zellen (murine embryonale Fibroblasten) des gleichen Stammes werden vom Erfinder im Rahmen eines anderen Projekts bereits erfolgreich kultiviert. Mithilfe des Cre-Plasmids für
30 die transiente Expression von Cre in ES-Zellen kann die Neo-Kassette nach Transfektion aus dem Genom der transfizierten ES-Zellen entfernen werden.

Transfektion der ES-Zellen

Zunächst wird das Gen in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) des C57/BL6 Stamm durch homologe Rekombination gegen sein mutiertes Gegenstück ausgetauscht, dies geschieht mit Hilfe eines sogenannten Targeting-Vektor. Unser Targetingvektor enthält außer dem mutierten Gen selektierbare Marker, nämlich Gene für Antibiotikaresistenzen. Der Targetingvektor wird mittels Elektroporation in die ES-Zellen gebracht. Dabei ermöglicht eine geschickte Kombination von Selektionsbedingungen auch die gezielte Isolation nur derjenigen ES-Zellen, bei denen das veränderte Gen in die richtige (homologe) Stelle eingebaut ist und nicht zufällig irgendwo ins Genom (Positiv/Negativ Selektion). Wir werden dann DNA-Proben von jedem isolierten Klon mittels Southern Blot Hybridisierung und PCR untersuchen, um diejenigen Transfektanten herauszufinden, die das Transgen an der richtigen Stelle im Genom eingebaut haben.

Entfernung der Selektionsmarkerkassette

Die Transfektanten, die das Transgen an der richtigen Stelle im Genom eingebaut haben werden nun weiter kultiviert und mit einem Cre-Plasmid transfiziert. Dadurch kann die Selektionskassette mittels transienter Cre-Expression aus dem Genom der ES-Zellen entfernt werden.

Die Eigenschaften der Rekombinationssysteme, z.B. des Cre-Systems, wurden mit verschiedenen herkömmlichen Gen Targeting- und Verdrängungs-Strategien (4, 5) kombiniert. Üblicherweise beruhen herkömmliche genomische Veränderungen auf der zielgerichteten Integration eines modifizierten Allels. In eukaryotischen und prokaryotischen Zellen wird das Integrationsereignis durch homologe Rekombination innerhalb von Regionen erreicht, die das interessierende Allel flankieren. Ein positiver genetischer Marker ist zur Selektion von homologen Rekombinationsereignissen obligat, die in den meisten genetischen Systemen recht selten vorkommen. Es ist deswegen oftmals wünschenswert, diesen Marker in einem nachfolgenden Schritt zu entfernen, vorzugsweise in Verbindung mit dem verbleibenden Wild-Typ Allel. Zur Entfernung des Markergens (oder von DNA-Segmenten, die deletiert werden sollen), ermöglichen eingebaute loxP-Sequenzen die effiziente Exzision des loxP-flankierten DNA-Segments in einer strikt Cre-abhängigen Weise. Das ausgeschnittene Fragment wird zirkularisiert und geht durch Abbau verloren, jedoch verbleibt eine einzelne loxP-Sequenz im modifizierten Gen-Ort.

Blastozysten-Injektion

Anschließend müssen die ES-Zellen, die das gefloxtete Allel an der richtigen Stelle enthalten und bei denen die Selektionskassette entfernt ist, in die Blastocyste injiziert werden, um Chimären zu erhalten. (Drei bis vier Tage nach der Befruchtung). Die Blastocyste, die etwa 100 Zellen enthält, wird pseudoschwangeren Weibchen implantiert. Embryonale Stammzellen der Maus sind in der Lage, an allen Aspekten der Entwicklung einschließlich der Keimbahn teilzunehmen. Somit können aus den injizierten ES-Zellen Keimzellen werden, die dann das mutierte Gen weitervererben. Die sich entwickelnden Mäuse sind in Bezug auf das veränderte Gen Chimären, daher einige der Gewebe leiten sich von den injizierten ES-Zellen ab, andere von der normalen Blastocyste.

10

Die Chimären lassen sich besonders einfach identifizieren, wenn der Mausstamm, der die Blastocyste spendet, weiß ist und der Mausstamm, aus dem die ES-Zellen stammen, eine dunkle Fellfarbe hat. Die chimärischen Nachkommen zeigen dann ein geflecktes Fell. Als Blastocysten-Spender benutzen wir den weißen CD 20-Stamm, ein Balb/c-Stamm, der 20 mal in C57/BL6 rückgekreuzt wurde.

15

Herstellung heterozygoter Mäuse

Meist sind auch die Keimzellen chimärisch; da diese jedoch haploid sind, enthalten nur einige von ihnen die Variante mit dem mutierten Gen. Es werden nun Testkreuzungen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob aus den eingebrachten ES-Zellen auch Keimzellen geworden sind. Die resultierenden chimären Männchen werden, um heterozygote Mutanten zu erzeugen, mit Wildtyp-Weibchen des Stammes C57/BL6 gekreuzt. Die Mutanten können mittels Southern-Blot und PCR eindeutig identifiziert werden.

20

Herstellung homozygoter Mäuse

Die heterozygoten F1-Mutanten werden untereinander gekreuzt, wodurch in der F2-Generation homozygote Mutanten erhalten werden. Die Mutanten können mittels Southern-Blot und PCR eindeutig identifiziert werden.

25

Beispiel 2

In Beispiel 2 wird beschrieben, wie die bisher unbekannte Mutation in der $\alpha 4$ -Untereinheit, nämlich T265I identifiziert wurde, und wie deren pharmakologische Eigenschaften durch Rekonstitutionsexperimente in *Xenopus* Oozyten charakterisiert wurden:

30

Patienten

Der Stammbaum einer deutschen Familie mit sechzehn lebenden Mitgliedern (einschließlich fünf Ehepartnern), ist in Figur 1A dargestellt. Klinische Daten wurden von allen lebenden Mitgliedern gewonnen. Zwei Individuen (III1, III2) im Alter von 31 und 38 Jahren waren
 5 betroffen. Sie wurden klinischen Untersuchungen unterzogen, nämlich EEGs zwischen zwei Anfällen (Figur 1B) und kranialen MRI-Scans. EEGs wurden ebenfalls von den fünf nicht betroffenen Trägern der CHRNA4- Mutation (Mutation T265I in der α 4-Untereinheit) gewonnen. Insgesamt neun Familienmitglieder und vier Ehepartner wurden bezüglich der An- oder Abwesenheit der Mutation gescreent. Die Kontrollprobe bestand aus DNA von 79 nicht
 10 verwandten deutschen gesunden Individuen.

Mutationsscreening und Verifizierung der Mutation

Ein Mutationsscreening wurde wie an früherer Stelle beschrieben durchgeführt (1), jedoch wurde eine Direktsequenzierung anstelle einer Einzelstrang-Konformationsanalyse (single
 15 strand confirmation analysis =SSCA) verwendet. Zur Verifizierung der Mutation, zur Analyse der gesamten ADNFLE-Familie und zum Screening der Kontrollprobe wurde ein PCR-Restriktionsfragmentlängen-Assay unter Verwendung der Primer n24942 (5' GGCGAGTGGGTCATCGTGG) und N54624 (5' GCTCGGGCCAGAAGCGCGG) entwickelt. Eine Standard-PCR wurde unter Verwendung eines Puffers durchgeführt, der
 20 2,0 mM MgCl₂ und 5% DMSO enthielt; eine Annealing-Temperatur von 64,3 °C und eine Verlängerungszeit von 45 Sekunden wurden gewählt. 5 µl des sich ergebenden PCR-Produktes wurden mit 4 U TaqI (Roche Molecular Biochemicals) für 7,5 Stunden bei 65 °C behandelt. Anschließend wurden 7 µl des geschnittenen PCR-Produktes auf einem 10% Polyacrylamidgel (15V/cm) für 2 bis 3 Stunden laufen gelassen. Nach der Elektrophorese
 25 wurden die Banden unter Verwendung einer Standardsilber-Färbungsvorschrift visualisiert. Die TaqI Restriktionsdigestion ergab das folgende Muster: Wildtyp-Allel, 42bp + 497bp; mutiertes Allel, 42bp + 260 + 237 bp (Figur 2A).

CHRNA4-Mutagenese

30 Der Expressionsvektor pSV2-ZEO (Invitrogen), der die CHRNA4 Wildtypsequenz enthielt, wurde zur in-vitro-Mutagenese verwendet. Der Expressionsklon CHRNA4-T265I wurde mit dem QuikChange Mutagenesis-Kit (Stratagene) gemäß den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung der nachfolgenden Primer konstruiert: n1554 5'-GTCTTCCTGCTGCTCATCATCGAGATCATCCCGTCCACC und n1594, 5'-

GGTGGACGGGATGATCTCGATGATGAGCAGCAGGAAGAC. Einzelne Kolonien wurden durch den TaqI Restriktions-Assay, oben beschrieben, gescreent und positive Klone wurden zur Verifizierung sequenziert.

5 Screening unterschiedlicher nAChR-Untereinheiten

Der TM1 - TM3 enthaltende Teil der nAChR-Untereinheitsgene CHRNA2-CHRNA3, CHRNA5-CHRNA7, CHRNA9-CHRNA10 und CHRNB2-CHRNB4 wurden durch PCR amplifiziert und anschließend durch Direktsequenzierung in den Familienmitgliedern II2 und III1 gescreent.

10

Elektrophysiologie

Expressionsexperimente in *Xenopus* Oozyten wurden wie an früherer Stelle beschrieben durchgeführt (2). Zellkern cDNA Injektionen wurden unter Verwendung eines Verhältnisses von 0,5 Kontroll $\alpha 4$, 0,5 mutiertem $\alpha 4$ und 1 $\beta 2$ (Gesamtmenge 2 ng/Oozyte) durchgeführt

15

(3). Die Oozyten wurden in BARTH-Lösung gehalten, die folgendes enthielt: 88 mM NaCl, 1mM KCl, 2,4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0,82 mM MgSO₄·7H₂O, 0,33 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0,41 mM CaCl₂·6H₂O, pH 7,4, eingestellt mit NaOH und ergänzt mit Kanamycin (20 µg/ml), Penicillin (100 µg/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Aufzeichnungen wurden zwei bis drei Tage später unter Verwendung der Zwei-Elektroden-

20

Spannungsklemmtechnik mit einem GENECLAMP-Verstärker bzw. Amplifier (Axon Instrument) durchgeführt. Während der Experimente wurden die Oozyten kontinuierlich mit OR2-Lösung gespült: 82,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4, eingestellt mit NaOH. Soweit nichts anderes angegeben ist, betrug das Haltepotential -100 mV und die Experimente wurden bei 18 °C durchgeführt. ACh-Dosis-Wirkungskurven

25

wurden am besten durch die Summe der beiden empirischen Hill-Gleichungen angepasst: $y = \text{Imax} \{ a / (1 + (EC_{50H}/x)^{nH1}) + (1-a) / (1 + (EC_{50L}/x)^{nH2}) \}$ (Gleichung (1)). Imax ist die maximale Stromamplitude und x ist die Agonistenkonzentration. EC_{50H}, nH1 und a sind jeweils die halb-effektive Konzentration, der Hill-Koeffizient der Prozentsatz der Rezeptoren im Hoch-Affinitätszustand, wohingegen EC_{50L} und nH2 der halb-effektiven Konzentration und dem Hill-Koeffizienten im Nieder-Affinitätszustand entspricht. Die Carbamazepin (CBZ) Hemm-Kurven wurden unter Verwendung einer ähnlichen Gleichung angepasst: $y = 1 / (1 + (x/IC_{50})^{nH})$ (Gleichung (2)), wobei x die Antagonisten-Konzentration ist. IC₅₀ und nH sind die Halb-Hemmkonzentration bzw. der Hill-Koeffizient.

30

Die neue CHRNA4 Mutation α 4-T265I verursacht eine nächtliche Frontallappenepilepsie (ADNFLE). Im Vergleich zu allen bisher bekannten nAChR Mutationen zeigt die α 4-T265I-Mutation eine bemerkenswert niedrige Penetranz, was mit einem Hauptgen-Effekt, jedoch nicht mit einer monogenen Vererbung konsistent ist. Unsere Ergebnisse zeigen, dass

5 zwischen den monogenen und oligogenen Formen der nächtlichen Frontallappenepilepsie ein Kontinuum existiert. Frühere Mutationsstudien konzentrierten sich auf typische ADNFLE-Familien, in denen die Existenz vieler betroffener Familienmitglieder in nachfolgenden Generationen zu einem autosomal-dominanten Modell der Vererbung passte. Es war deswegen nicht wahrscheinlich, dass sie Hauptgen-Effekte entdeckten. Es wäre interessant,

10 Patienten mit apparenten sporadischen Formen der nächtlichen Frontallappenepilepsie zu screenen, um die Häufigkeit von Nieder-Penetranz CHRNA4- oder CHRNB2-Mutationen in dieser Gruppe einzuschätzen.

Literatur

Übersichtsartikel

Steinlein, O. (1996): Familiäre nächtliche Frontallappenepilepsie. Nervenarzt 67:870-874

5

Steinlein, O. (1999): Die Genetik der idiopathischen Epilepsien. Deutsches Ärzteblatt 96:1047-1052

Steinlein, O. (1999): Idiopathic epilepsies with a monogenic mode of inheritance. Epilepsia 40 Suppl 3:9-11

10

Epilepsia 2002;43 Suppl 5:112-22

Neurophysiol Clin 2002 Apr;32(2):99-107

15

Epilepsia 2002 Apr;43(4):362-4

Pflugers Arch 2001 Aug;442(5):642-51

20 Originalartikel:

De Fusco, M.; Becchetti, A.; Patrignani, A.; Annesi, G.; Gambardella, A.; Quattrone, A.; Ballabio, A.; Wanke, E.; Casari, G. (2000): The nicotinic receptor beta-2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. Nature Genet. 26: 275-276.

25 Haymann, M.; Scheffer, I. E.; Chinvarun, Y.; Berlangieri, S.U.; Berkovic, S. F. (1997): Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: demonstration of focal frontal onset and intrafamilial variation. Neurology 49: 969-975.

Hirose S, IwataH, Akiyoshi H, Kobayashi K, Ito M, Wada K, Kaneko S, Mitsudome A.
30 (1999): A novel mutation of CHRNA4 responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Neurology 53: 1749-1753.

- Niedermeyer (1987) Maturation of the EEG: Development of waking and sleep patterns. In: Niedermeyer E, Lopes da Silva F (eds) *Electroencephalography*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 133-157.
- 5 Niedermeyer E (1987) Sleep and EEG. In: Niedermeyer E, Lopes da Silva F (eds) *Electroencephalography*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 119-132.
- Phillips, H. A.; Favre, I.; Kirkpatrick, M.; Zuberi, S. M.; Goudie, D.; Heron, S. E.; Scheffer, I. E.; Sutherland, G. R.; Berkovic, S. F.; Bertrand, D.; Mulley, J. C. (2001): CHRNA2 is the
 10 second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 225-231
- Phillips, H. A.; Scheffer, I. E.; Berkovic, S. F.; Hollway, G. E.; Sutherland, G. R.; Mulley, J. C. (1995): Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to
 15 chromosome 20q13.2. *Nature Genet.* 10: 117-118.
- Sander T (1996): *Mol Med Today* 2: 173-80
- Scheffer, I. E.; Bhatia, K. P.; Lopes-Cendes, I.; Fish, D. R.; Marsden, C. D.; Andermann, E.; Andermann, F.; Desbiens, R.; Keene, D.; Cendes, F.; Manson, J.I.; Constantinou, J. E. C.;
 20 McIntosh, A.; Berkovic, S. F. (1995): Autosomal dominant nocturnal frontal epilepsy: a distinctive clinical disorder. *Brain* 118: 61-73.
- Scheffer, I. E.; Hopkins, I. J.; Harvey, A. S.; Berkovic, S. F. (1994): New autosomal-dominant partial epilepsy syndrome. (Abstract) *Pediat. Neurol.* 11: 95.
- 25 Steinlein, O. K.; Magnusson, A.; Stoodt, J.; Bertrand, S.; Weiland, S.; Berkovic, S. F.; Nakken, K. O.; Propping, P.; Bertrand, D. (1997): An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum. Molec. Genet.* 6: 943-947.
- 30 Steinlein, O. K.; Mulley, J. C.; Propping, P.; Wallace, R.H.; Phillips, H. A.; Sutherland, G. R.; Scheffer, I. E.; Berkovic, S. F. (1995): A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genet.* 11: 201-203.

Steinlein, O., Noebels, J. (2000): Ion channels and epilepsy in man and mouse. *Current Opinion in Genetics & Development* 10: 286-291

5 Literatur zu Beispiel 2:

1. Steinlein O, Weiland S, Stoodt J, Propping P. Exon-intron structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit (CHRNA4). *Genomics* 1996;32:289-294.
- 10 2. Bertrand D, Cooper E, Valera S, Rungger D, Ballivet M. Electrophysiology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes following nuclear injection of genes or cDNA. In: *Methods in Neuroscience* (Conn M, ed) 1991, pp 174-193. New York: Academic Press.
- 15 3. Moulard B, Picard F, le Hellard S, et al. Ion channel variation causes epilepsies. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;36:275-284.

PATENTANSPRÜCHE

1. Transgenes nicht-menschliches Tier, vorzugsweise eine Knock-in-Maus, die eine Missense-Mutation in der $\alpha 4$ - oder $\beta 2$ -Untereinheit des neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChr) aufweist.
2. Tier nach Anspruch 1, die die Missense-Mutation V287L oder V287M im Gen für die $\beta 2$ -Untereinheit trägt.
3. Tier nach Anspruch 1, die die Missense-Mutation 259-260ins, S252L, 766ins3 oder T265I in der $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChr-Rezeptors trägt.
4. Tier nach einem der Ansprüche 1 - 3, die die Missense-Mutation homozygot enthält.
5. Tier nach einem der Ansprüche 1 - 3, die die Missense-Mutation heterozygot enthält.
6. Targetingvektor, der die folgenden Komponenten in funktioneller Verbindung enthält:
 - die genomische und/oder cDNA-Sequenz für eine Untereinheit des, vorzugsweise menschlichen oder murinen, nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChr), die eine Missense-Mutation in der $\alpha 4$ oder $\beta 2$ -Untereinheit aufweist, oder einen Teil der Untereinheit, wobei der Teil zumindest die Missense-Mutation in der $\alpha 4$ oder $\beta 2$ -Untereinheit aufweist,
 - ein selektierbares Markergen, und
 - wahlweise 2 Erkennungssequenzen für eine Rekombinase, die das Markergen flankieren.
7. Targetingvektor nach Anspruch 6, wobei der selektierbare Marker ein Antibiotikaresistenzgen ist.
8. Targetingvektor nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Erkennungssequenzen jeweils loxP sind.
9. Targetingvektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 6-8, wobei die $\beta 2$ -Untereinheit die Missense-Mutation V287L oder V287M trägt.

10. Targetingvektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 6-8, wobei die $\alpha 4$ -Untereinheit die Missense-Mutation 259-260ins, S252L, 766ins3 oder T265I trägt.
- 5 11. Stammzelle, vorzugsweise murine embryonale Stammzelle, die einen Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 6-10 enthält.
12. Screeningverfahren zur Identifizierung von Verbindungen zur Behandlung des humanen Epilepsiesyndroms, insbesondere der familiären, nächtlichen Frontallappenepilepsie (ADNFLE), das die folgenden Schritte umfasst:
- 10 a) Bereitstellen eines Tieres nach einem der Ansprüche 1-5, und von Testverbindungen,
- b) Verabreichen der Testverbindungen an das Tier,
- c) Auswählen einer Testverbindung, die eine Linderung oder Beseitigung der Symptome des Epilepsiesyndroms bei dem Tier ergeben, und
- 15 d) wahlweise Wiederholen der Schritte a)-c) mit einer in geeigneter Weise modifizierten Form der in c) ausgewählten Testverbindung.
13. Screeningverfahren nach Anspruch 12, bei dem die Testverbindungen aus folgenden Gruppen ausgewählt sind:
- 20 - Barbiturate, Hydantoine, Oxazolidindione und Succinimide und weitere Gruppen, die als gemeinsames Strukturelement die Gruppierung:
- $$\begin{array}{ccccccc}
 & R^2 & O & & R^3 & O & \\
 & | & || & & | & || & \\
 - & C & - C & - N & - C & - & \\
 & | & & & & & \\
 & R^1 & & & & &
 \end{array}$$
- 25
- 30 aufweisen,
- wobei R^1 und R^2 Alkyl- oder Arylreste und R^3 H oder einen Alkylrest bedeuten, oder
- Derivate von Benzodiazepinen, Sultiam, Carbamazepin und der Valproinsäure.
- 35 14. Verbindung zur Behandlung des humanen Epilepsiesyndroms, vorzugsweise von ADNFLE, die durch das Verfahren nach Anspruch 12 oder 13 identifiziert worden ist.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis einer oder mehrerer Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 12-14 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger aufweist.

5

16. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 15 zur Behandlung des humanen Epilepsiesyndroms, vorzugsweise von ADNFLE.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Tiere, insbesondere eine Knock-in-Maus sowie einen Targetingvektor, der zur Generierung eines solchen Tieres wie einer Knock-in-Maus vorgesehen ist. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Stammzellen, vorzugsweise murine embryonale Stammzellen, die diesen Targetingvektor enthalten sowie ein Screeningverfahren zur Identifizierung von Verbindungen zur Behandlung des humanen Epilepsiesyndroms, insbesondere der familiären nächtlichen Frontallappenepilepsie (ADNFLE).

10

15